

## ⑫ 公開特許公報(A) 平1-235595

⑬ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成1年(1989)9月20日

C 12 P 13/14  
 13/06  
 13/08  
 13/24  
 //(C 12 P 13/14  
 C 12 R 1:01)  
 (C 12 P 13/06  
 C 12 R 1:01)  
 (C 12 P 13/08  
 C 12 R 1:01)  
 (C 12 P 13/24  
 C 12 R 1:01)

A-7236-4B  
 B-7236-4B  
 D-7236-4B  
 C-7236-4B

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全4頁)

⑮ 発明の名称 発酵法によるアミノ酸の製造法

⑯ 特 願 昭63-59794

⑰ 出 願 昭63(1988)3月14日

⑱ 発 明 者 荒 木 和 美 東京都町田市南成瀬1-12-7

⑲ 発 明 者 下 村 順 子 東京都世田ヶ谷区赤堤2-16-11

⑳ 出 願 人 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

## 明 細 書

いることにある。

## 従 来 の 技 術

## 1. 発明の名称

発酵法によるアミノ酸の製造法

## 2. 特許請求の範囲

(1) メチロバチルス属に属し、温度感受性でかつアミノ酸生産能を有する微生物を、メタノールを主炭素源とする培地に培養し、培養物中にアミノ酸を生成蓄積させ、該培養物から該アミノ酸を採取することを特徴とする発酵法によるアミノ酸の製造法。

(2) 該アミノ酸がL-グルタミン酸、L-ヒスチジン、L-バリンまたはL-ロイシンから選ばれる特許請求の範囲第1項記載の方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 産業上の利用分野

本発明は、食品、医薬品として有用なL-グルタミン酸、L-ヒスチジン、L-バリンおよびL-ロイシンの製造法に関し、その特徴は、メタノール炭化性細菌で温度感受性を有する変異株を用

メタノール炭化性を有する微生物を、メタノールを主炭素源とする培地を用いて培養することにより、アミノ酸を製造する方法は種々知られている。L-グルタミン酸の製造法としては、アクロモバクター属、シュードモナス属の細菌を用いる方法(特公昭45-25273)、バチルス属、プレビバクテリウム属、ミクロコッカス属、セラチア属の細菌を用いる方法(特公昭48-98092)、プロタミノバクター属、ミクロサイクラス属、セラチア属の細菌を用いる方法(特公昭49-34837、同49-34834)、シュードモナス属およびプロタミノバクター属の栄養要求性変異株を用いる方法(特開昭50-40786)、メチロモナス属細菌を用いる方法(特開昭50-89591)などが知られている。また、L-ロイシンおよびL-バリンの製造法としては、アクロモバクター属またはシュードモナス属の細菌を用いる方法(特公昭45-25273)、プロタミノバクター属の細菌を用いる方法(特公昭49-125590)、ビキア属群

母を用いる方法（特公昭55-38116）、メチロモナス属細菌を用いる方法（特公昭56-1912）などが知られている。L-ヒスチジンについては、ハイフオミクロビウム属細菌で微量のL-ヒスチジンを分泌することが知られている（特公昭56-10034）。しかし、メタノール酸化性菌から誘導した温度感受性変異株によるアミノ酸の製造法については、これまで全く報告がない。

#### 発明が解決しようとする課題

従来知られているメタノールを主炭素源とする培地を用いた発酵法によるアミノ酸の製造法は、発酵収率が低く、生産性もまだまだ満足すべきものではない。従って、工業的に安価にアミノ酸を製造する方法の開発は、常に求められている。

#### 課題を解決するための手段

本発明者は、メタノール酸化性細菌であるメチロバチルス属細菌から誘導した温度感受性変異株の中に、著量のL-グルタミン酸、L-ヒスチジン、L-バリンまたはL-ロイシンを蓄積する能力を有する変異株を見出し本発明を完成した。

リコゲネスATCC 21276株を親株として常法に従って変異処理を施し、これに温度感受性を付与することによって容易に得ることができる。

メチロバチルス・グリコゲネスATCC 21276株は、元素シュードモナス・インスエタATCC 21276として、特公昭45-25273において使用された菌株であるが、本明細書では、最近の分類学的研究〔インターナショナル・ジャーナル・オブ・システムティック・バクテリオロジー (International Journal of Systematic Bacteriology), 36, 502~511 (1986)〕にもとづいて、メチロバチルス属細菌と改称して記載している。

上記のようにして得られる温度感受性変異株を、メタノールを主炭素源とする培地で培養し、L-グルタミン酸、L-ヒスチジン、L-バリンまたはL-ロイシンの生産能が親株より向上した変異株を選択して本発明に使用する。

次に、これらの変異株を得る具体例を説明する。

メチロバチルス・グリコゲネスATCC 21276（野生株）を常法によって、N-メチル-N'-ニト

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明は、メチロバチルス属に属し、温度感受性でかつアミノ酸生産能を有する微生物を、メタノールを主炭素源とする培地に培養し、培養物中にアミノ酸を生成蓄積させ、該培養物から該アミノ酸を採取することを特徴とする発酵法によるアミノ酸の製造法を提供する。

該アミノ酸としては、L-グルタミン酸、L-ヒスチジン、L-バリンまたはL-ロイシンがあげられる。

本発明に使用する微生物は、メチロバチルス属に属し、温度感受性でかつアミノ酸生産能、例えばL-グルタミン酸生産能、L-ヒスチジン生産能、L-バリン生産能またはL-ロイシン生産能の向上した変異株であれば、いずれの変異株でもよい。温度感受性変異株とは、通常の生育温度、例えば28℃では親株と同等に生育するが、高温条件下、例えば42℃では生育しないかまたは親株と比較して明らかに生育の劣る変異株をいう。

これらの変異株は、例えばメチロバチルス・グ

ロ-N-ニトロソグアニジン300μg/mlで変異処理し、その細胞懸濁液を最少寒天培地（メタノール0.5% (v/v), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2g/dl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1g/dl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7g/dl, NaCl 0.01g/dl, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05g/dl, チオ尿素0.01g/dl, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10mg/l, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 8mg/l, サイアミン·HCl 1mg/l, ビオチン50μg/l, 寒天2g/dl (NaOHでpH 7.2に調整)）に、平板当り300~1000個のコロニーが発現するように希釈して塗抹し、28℃の温度条件下で1~2日間静置培養した。小さなコロニーが発現したところで平板を42℃の温度条件下に移して、さらに3~4日間培養を続けた後、小コロニーのみを約900個約測した。これらを、上記と同じ最少寒天培地に1株につき2枚ずつの寒天平板に塗抹して、各々を28℃と42℃の両方で培養し、28℃では親株と同等に生育するが、42℃では生育しないかもしくは親株と比較して明らかに生育の劣る変異株を約60

株分離した。これらの温度感受性変異株を、後述の実施例 1 に示したのと同様の培養条件下で培養を行った結果、親株と比較して著量のアミノ酸を蓄積する変異株が多数見出された。そのうちの代表的な 4 株を選択した。

このようにして分離した温度感受性変異株は、それぞれ、メチロバチルス・グリコゲネス No. 45 (L-グルタミン酸生産能の向上した変異株)、メチロバチルス・グリコゲネス No. 12 (L-ヒスチジン生産能)、メチロバチルス・グリコゲネス No. 16 (L-バリン生産能の向上した変異株)、メチロバチルス・グリコゲネス No. 36 (L-ロイシン生産能の向上した変異株) として、工業技術院微生物工業技術研究所(微工研)に昭和 63 年 3 月 9 日付で FERM BP-1790、FERM BP-1787、FERM BP-1788、FERM BP-1789 として寄託されている。

本発明に使用する培地としては、炭素源、窒素源、無機物その他使用菌の必要とする微量の栄養物を程よく含有するものであれば、天然培地、合成培地のいずれもが使用可能である。

攪拌培養などの好氣的条件下で 1～8 日間培養する。培養終了後、培養物より蓄積したアミノ酸を採取するには、イオン交換樹脂法などの常法が用いられる。

以下に実施例を示す。

#### 実施例 1

メタノール 20 ml、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  8 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g、 $\text{NaCl}$  1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  10 mg、サイアミン・HCl 1 mg、ビオチン 50  $\mu\text{g}$ 、コーン・ステープ・リカー 3 g、フェノール レッド 10 mg、 $\text{CaCO}_3$  2% を水で 1% とした組成の種培地 (pH 7.2) 3 ml を含む試験管 (16 mm  $\times$  160 mm) にメチロバチルス・グリコゲネス No. 45 (L-グルタミン酸生産能)、メチロバチルス・グリコゲネス No. 12 (L-ヒスチジン生産能)、メチロバチルス・グリコゲネス No. 16 (L-バリン生産能)、メチロバチルス・グリコゲネス No. 36 (L-ロイシン生産能) をそれぞれ 1 エーゼ接種し、30℃で、210

炭素源としては、メタノール、メタノール・アミンなどが使用できる。その他、糖類、有機酸類、他のアルコール類など使用菌の利用可能なものならば、単一あるいは混合して使用してもよい。

窒素源としては、塩化アンモニウム、アンモニア水、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどのアンモニウム化合物、尿素、ペプトン、肉エキス、コーン・ステープ・リカー、カゼイン加水分解物、大豆粕加水分解物などの天然物由来の窒素含有物などが使用できる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガンおよび炭酸カルシウムなどが使用できる。使用菌が栄養要求性を持つ場合には、これらの物質を適量培地に添加する。微生物の生育に必要なとするビタミン、アミノ酸類などは、前記したような他の培地成分によって培地に供給されれば特に加えなくてもよい。

培養温度は 20～50℃で振盪培養または通気

rpm の振盪条件下で 24 時間振盪培養した。得られた種培養液を、上記の種培地と同一組成の培地 20 ml を含む邪魔板付の 300 ml 容三角フラスコに 2 ml 宛接種し、30℃で 210 rpm の振盪条件下で振盪培養した。培養 16 時間目に 2% (v/v) のメタノールを添加して、合計 48 時間培養した。対照として、親株である ATCC 21276 株も同様に培養した。

その結果、培養物中には親株の ATCC 21276 株では L-グルタミン酸が 1.2 mg/ml、No. 45 株では L-グルタミン酸が 6.7 mg/ml、No. 12 株では L-ヒスチジンが 0.4 mg/ml、No. 16 株では L-バリンが 1.1 mg/ml、No. 36 株では L-ロイシンが 1.5 mg/ml それぞれ蓄積した。

#### 実施例 2

メタノール 20 ml、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  25 mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  8 mg、サイアミン・HCl 2 mg、ビオチン 50  $\mu\text{g}$ 、ペプトン 10 g を 1% の

水を含む組成の培地(pH7.2)2.7ℓを5ℓ容ジャーフェーマンターに分注し、これに実施例1と同様の方法で得られたメチロバチルス・グリコゲネスNo.45の種培養300mlを接種し、450rpmの回転数、3ℓ/minの通気条件下で30℃で通気攪拌培養を行った。培養中アンモニア添加によってpHを6.8に維持し、培養開始10時間目から46時間目までの間にメタノールを1時間当たり0.4~0.5%(v/v)の割合で添加し、合計62時間培養した。その結果、培養物中には34.5mg/mlのL-グルタミン酸が蓄積した。対照として同様に培養した親株ATCC 21276株は、3.2mg/mlのL-グルタミン酸しか蓄積しなかった。

#### 発明の効果

本発明によれば、メタノールを主炭素源とする培地を用いて、L-グルタミン酸、L-ヒスチジン、L-バリン、L-ロイシンを高率よく製造することができる。

特許出願人 (102) 協和醗酵工業株式会社  
代表者 加藤 幹 夫

